

Palkokasvin, keräsienten ja typpibakteerien välinen kolmiosainen vuorovaikutus  
ja sen hyödyntämismahdollisuudet kestävässä maataloudessa

Eveliina Ekström

LuK-seminaari ja –tutkielma 750376A

Biologian tutkimusyksikkö

Oulun yliopisto

2.12.2021

## Sisällysluettelo

<b>1 Johdanto.....</b>	<b>3</b>
<b>2 Kasviosakkaan juuren rakenne .....</b>	<b>6</b>
<b>3 Keräsienet .....</b>	<b>7</b>
3.1 Keräsienen rakenne.....	7
3.2 Isäntäkasvin kolonisointi.....	7
3.3 Keräsienisymbioosin vaikutus isäntäkasviin .....	9
3.4 Fosforinotannon fysiologia .....	10
<b>4 Typpibakteerit.....</b>	<b>11</b>
4.1 Juurinyströiden muodostuminen .....	11
4.2 Typpibakteerien vaikutus isäntäkasviin .....	12
4.3 Typensidonnan fysiologia.....	13
<b>5 Keräsienen ja typpeä sitovien bakteerien vuorovaikutus ja niitä yhdistävät tekijät ...</b>	<b>14</b>
5.1 Yleinen symbioosireitti ( <i>Common symbiotic pathway</i> ) .....	14
5.2 Hiilen allokointi.....	15
5.3 Kilpailu symbionttien välillä .....	15
<b>6 Kolmiosaisen vuorovaikutuksen hyödyntäminen maataloudessa .....</b>	<b>17</b>
6.1 Keräsienijuurisymbioosin hyödyntäminen maataloudessa .....	17
6.2 Typpeä sitovien bakteerien hyödyntäminen maataloudessa .....	18
6.3 Mikrobiomin hyödyntäminen maataloudessa.....	19
<b>7 Johtopäätökset.....</b>	<b>20</b>
<b>8 Lähteet .....</b>	<b>22</b>

## 1 Johdanto

Jatkuvasti kasvavan ihmispopulaation myötä lisääntynyt ravinnon kulutus vaatii yhä useampia hehtaareja maapinta-alaa maatalouskäyttöön (Igiehon & Babalola 2018, Vijayakumar 2018). Ruokaturvan toteutuminen tarkoittaa riittävän ja laadukkaan ravinnon tuotantoa jatkuvasti kasvavalle väestölle kuitenkin ilman ympäristön tilan heikentämistä. Tämän saavuttamiseksi kestävä kehitys maatalouden saralla on välttämätöntä (Lugtenberg (toim.) 2014, Igiehon & Babalola 2018). Paine kehittää uusien keksintöjä pohjaa myös tuoreisiin mittaus- ja tutkimusmenetelmien antamiin tuloksiin, joiden mukaan maataloudessa käytettävillä kemikaaleilla on haitallisia vaikutuksia ihmisten terveyteen (Barea, Werner, Azcón-Guilar & Azcón 2005).

Igiehon & Babalola (2018) mukaan yksi modernin maatalouden ongelmista on lannoitteiden runsas käyttö, mikä on haitallista ympäristölle. Typpi on yksi tärkeimmistä kasvin tarvitsemista ravinteista, joten nykyaikainen maatalous tarvitsee jonkin kestävä ja turvallisen vaihtoehdon typenlähteeksi sadoille. Typpi on usein kasvin kasvua eniten rajoittava tekijä johtuen sen rajallisesta saatavuudesta (Lugtenberg (toim.) 2014), Igiehon & Babalola 2018). Typen liian niukka saanti voi johtaa esimerkiksi hidastuneeseen kasvuun tai lehtien kellastumiseen (Igiehon & Babalola 2018). Myös fosforia on maaperässä usein niukasti, joten sen puutetta voidaan joutua korvaamaan lannoitteilla (Smith & Smith 2011). Fosforin vähäinen saanti rajoittaa kasvien kasvua (Vestberg & Timonen 2018).

Riittävän typen- ja fosforinsaannin voidaan sanoa olevan edellytys tuottoisille sadoille, jonka vuoksi niiden liian vähäistä saantia on paikattu lannoitteilla. Lannoitteina käytetyillä typpiyhdisteillä on kuitenkin havaittu olevan negatiivinen vaikutus esimerkiksi erilaisiin maa- ja vesiekosysteemeihin typen huuhtoutuessa pohjavesiin, vapautuessa typpioksidina ilmakehään ja maaperän happamoituessa (Vijayakumar 2018). Fosforilannoitteista peräisin oleva fosfori voi päätyä vesiekosysteemeihin, joissa sillä on rehevöittävä vaikutus. Se esimerkiksi lisää haitallisten levien kasvua etenkin makeissa vesissä (Witers, Neal, Jarvie, & Doody 2014).

Azcón & Barea (2010) mukaan kasvumaan laadun ylläpito on tärkeää toimivien maatalousekosysteemien ylläpidossa, sillä maaperän ravinteikkaus on yksi terveiden ja tuottoisien satojen kasvattamisen kannalta tärkeimmistä tekijöistä. Maaperän eri komponenttien kemialliset, fysikaaliset sekä biologiset vuorovaikutukset vaikuttavat kasvumaan laatuun sekä hedelmällisyyteen. Mikrobiyhteisöjen koostumuksella ja toiminnalla

on vaikutusta maaperän kasvien kasvun kannalta tärkeisiin toimintoihin, kuten saatavilla olevien ravinteiden määrään. Maaperän mikro-organismit ovat myös osana maa-aineksen ja ravinteiden biogeokemiallista kiertoa, joka vaikuttaa osaltaan ritsosfäärin rakenteeseen (Azcón & Barea 2010).

Ritsosfääriksi kutsutaan kasvin juurten vaikutuspiirissä olevaa maaperää. Ritsosfäärissä on esimerkiksi kasvin juurten eritteitä ja erilaisia mikro-organismeja. Ritsosfäärin mikrobiomin hyödyntäminen voi olla varteenotettava ratkaisu – tai osa sitä – mitä tulee riittävään ja laadukkaaseen ravinnontuotantoon tulevaisuudessa. Mikrobiomin hyödyntäminen edistää kasvien kasvua, tuottoisuutta ja terveyttä kuitenkin vähentäen ympäristön saastumista (Igiehon & Babalola 2018, Vijayakumar 2018).

Kolmiosaiseksi vuorovaikutukseksi voidaan kutsua vuorovaikutusta kolmen eliön välillä, esimerkiksi symbionttista suhdetta typensitojabakteerien, keräsienten (arbuscular mycorrhizal (AM) fungi) ja palkokasvin välillä. Symbioosi tarkoittaa kahden organismin välistä tiiviissä fyysisessä läheisyydessä ja vuorovaikutuksessa elämistä (Smith & Smith 2011). Vuorovaikutus voi olla joko isäntäkasville haitallista, kuten patogeenien tapauksessa, tai molemmille osakkaille hyödyllistä. Molemmille osakkaille hyödyllistä vuorovaikutusta kutsutaan mutualistiseksi suhteeksi. Symbionttinen suhde voi olla myös neutraali (Azcón & Barea 2010). Palkokasveilla on luontainen kyky muodostaa symbioosi niin typensitojabakteerin kuin keräsienten kanssa (Igiehon & Babalola 2018). Kolmiosainen vuorovaikutus tehostaa palkokasvien kasvua ja kehitystä ravinneköyhemmissäkin maaperissä (Chang, Nasir, Ma & Tian 2017).

Yhdistyneiden kansakuntien elintarvike- ja maatalousjärjestö (FAO) (2019) määrittelee luonnonmukaisen maatalouden tuotantosysteemiksi, joka edistää maatalousekosysteemin terveyttä huomioiden biodiversiteetin, biologiset kierrot ja maaperän biologisen aktiivisuuden. Luonnonmukaisen maatalouden periaatteiden mukaisessa maataloudessa mahdollisimman suuri osa synteettisistä lannoitteista tai tuholaistorjunta-aineista korvataan luonnonmukaisilla vaihtoehdoilla.

FAO:n (2019) mukaan tavoitteena on siis korvata vaaralliset lannoitteet ja tuholaismyrkyt ympäristöystävällisillä mikro-organismeilla, jotka sekä parantavat satoisuutta, että tarjoavat suojaa bioottiselta sekä abioottiselta stressiltä. Eristetyt mikrobit siirretään kasviin esimerkiksi lisäämällä niitä maaperään tai vaihtoehtoisesti suoraan johonkin kasvinosaan, kuten

siemeneen. Siirros voi olla yksittäinen mikro-organismi tai sekoitus niitä (Igiehon & Babalola 2018).

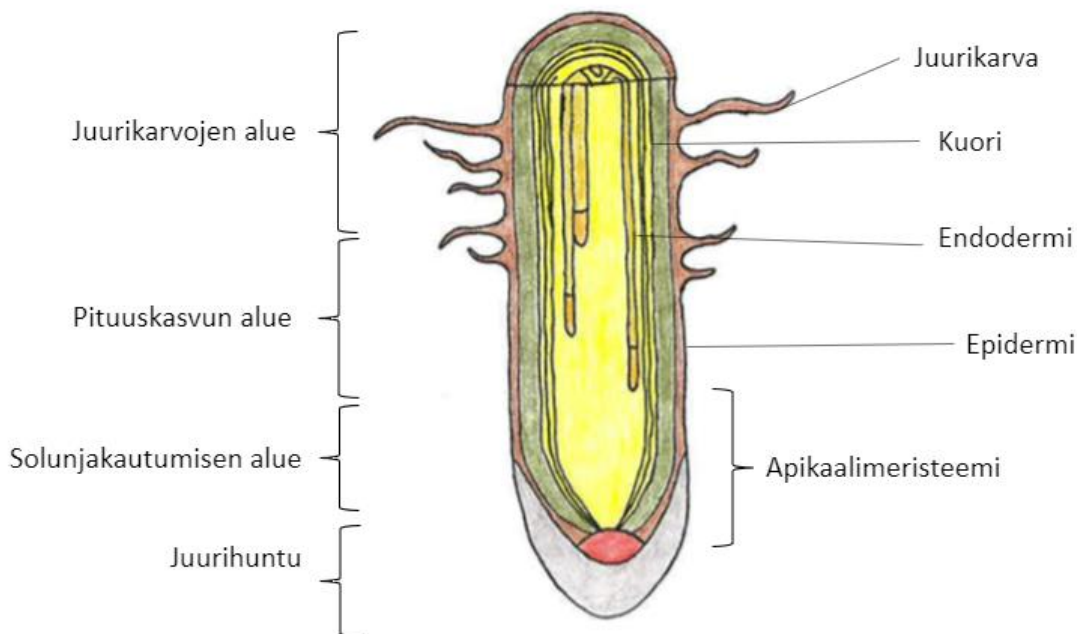
Tässä kirjallisuuskatsauksessa tutustutaan palkokasvin, keräsienten ja typpibakteerin välisen kolmiosaisen vuorovaikutuksen symbionttiosakkaisiin, symbioosin muodostumiseen ja sen hyödyntämismahdollisuuksiin kestävässä ruoantuotannossa.

## 2 Kasviosakkaan juuren rakenne

Kasviosakas yhteyttää hiiliyhdisteet, joita sen symbiontit juurissa tarvitsevat elääkseen. Ravinteiden ja hiiliyhdisteiden vaihto tapahtuu juurissa (Smith & Smith 2011).

Alin osa yksittäisestä juuresta on juurihuntu, jonka tehtävänä on suojata juuren apikaalimeristeemiä eli kärkikasvusolukkoa (Kuva 1. Mauseth 2016). Juurihunnun ja apikaalimeristeemin yläpuolella sijaitsee pituuskasvun alue, jossa solut kasvavat ja jakautuvat. Sen yläpuolella on juurikarvojen alue, jossa suuri osa epidermin eli ulkokerroksen soluista pitenee trikomeiksi eli pieniksi solukarvoiksi. Juurikarvojen alue on juuren ainoa osa, joka ei kasva pituutta. Kasvumaan mikroympäristöstä riippuen juuri kasvattaa juurikarvojen alueen yläpuolelle lateraalisia eli sivuttain kasvavia juuria. Mitä ravinteikkaampi maaperä, sitä enemmän lateraalista juuristoa (Mauseth 2016).

Keräsiennellä juuren kolonisaatio lähtee liikkeelle juuren uloimmasta kerroksesta eli epidermistä. Suuri osa sienijuuren rakenteista on kuorisoluissa (Vestberg & Timonen 2018, Mauseth 2016). Typpibakteerien kolonisaatiota edeltävät voimakkaat kalsiumin värähtelyt tapahtuvat epidermi- ja kuorisoluissa (Chang ym. 2017).



Kuva 1. Mukailleen Mauseth (2016). Juuren rakenne.

### 3 Keräsienet

Keräsieniksi kutsutaan Glomeromycotina-alakaareen kuuluvia sieniä. Keräsienillä ei ole lainkaan suvullista vaihetta, mikä vaikeuttaa niiden luokittelua (Vestberg & Timonen 2018). AM-sienisymbioosin osuuden tutkimista kolmiosaisessa vuorovaikutuksessa hankaloittaa se, että AMF on obligatorinen mutualisti eli se vaatii isäntäkasvin toteuttaakseen täydellisen elämänsykliänsä. Tämä rajoittaa kvantitatiivisesti erilaisten ryhmien tuottoa kokeellisissa tutkimuksissa (Antunes & Goss 2005, Azcón & Barea 2010).

Keräsienten kolonisoimalla kasvilla on kaksi mahdollista tapaa ravinteidenottoon: joko suoraan juurten epidermin ja siitä lähtöisin olevien juurikarvojen avulla, tai keräsieniosakkaan rihmojen (AM-rihmojen) kautta, jolloin ravinteet ja hiili vaihtuvat osakkaiden välillä juuren kuori- eli kortikaalisoluissa sieniosakkaan kerästen eli arbuskelien kautta (Smith & Smith 2011).

#### 3.1 Keräsienen rakenne

Keräsienijuuri koostuu rihmastosta, keräsistä, varastorakkuloista sekä juuren ulkopuolelle muodostuvasta rihmastoverkostosta, johon sienen itiöt muodostuvat (Kuva 2. Vestberg & Timonen 2018). Kortikaalisolujen sisällä olevien arbuskelien sisällä tapahtuu suurin osa sienen ja isäntäkasvin välisestä ravinteiden vaihdosta (Azcón & Barea 2010, Lugtenberg (toim.) 2014). Keräsienten kolonisoimat kasvit pystyvät ottamaan tehokkaammin typpeä ja etenkin fosforia (Ossler ym. 2015, Chang ym. 2017).

#### 3.2 Isäntäkasvin kolonisointi

Keräsienen itiöiden itämiseen vaikuttavat muun muassa maaperän ominaisuudet, kuten sen pH, lämpötila hiilidioksidipitoisuus, ravinteista erityisesti fosforin määrä, isäntäkasvi ja sen ominaisuudet sekä muu maaperän mikrobisto (Vestberg & Timonen 2018). Keräsienen itiöt itävät itsenäisti ilman isäntäkasvia ja kehittävät asymbionttisen rihmaston, joka ei pysty kasvamaan muutamaa päivää enempää ilman isäntäkasvin juurta (Lugtenberg (toim.) 2014).

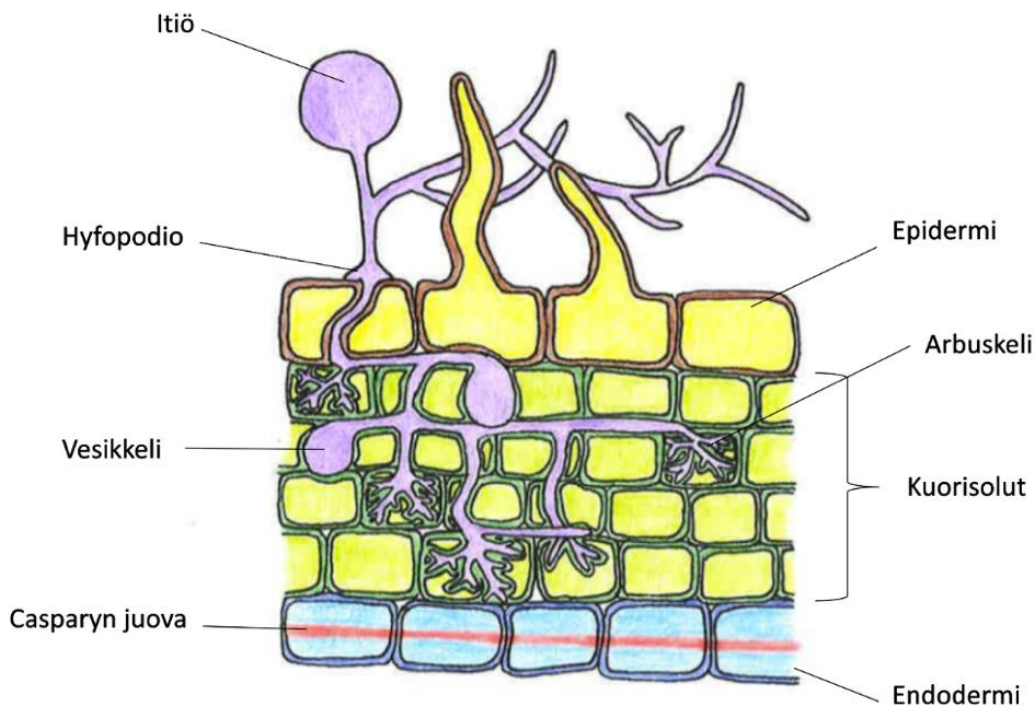
Sieniosakkaan alkurihmaston kehittyessä kasviosakkaan juuressa vaikuttaa voimakas apikaalidominanssi, joka tarkoittaa sitä, että juuren kasvu keskittyy pääjuureen sivujuurten sijaan. Lukuisat juurieritteet, kuten aminohapot, sokerit, polysakkaridit, sterolit ja fenolit

stimuloivat kasvua ja suppressoivat apikaalidominanssia, jolloin juuristosta alkaa kasvaa rihmastomaisempaa (Vestberg & Timonen 2018).

Appressorioksi tai hyfopodioksi kutsutaan juuren ja sienirihman kärjen kohtaamispaikkaa. Sieni muodostaa paksuuntuneen painerihman päällyskettosolun pintaan (Lugtenberg (toim.) 2014, Vestberg & Timonen 2018). Tämän jälkeen isäntäkasvi muodostaa kanavan, joka kulkeutuu päällyskettosolun lävitse. Kanavaa pitkin hyfopodiosta lähtevän rihman on helppo kasvaa. Rihma jää kuitenkin isäntäkasvin solukalvon sisäpuolelle.

Sienirihma tunkeutuu yhä syvemmälle isäntäkasvin juuristoon soluseinien läpi ja kuorisolujen väleihin. Sienirihman kasvu tapahtuu tuma edellä. Seuraavana vaiheena on dikotominen haarautuminen ja haarakerästen muodostuminen, mikä tapahtuu sienirihman tunkeuduttua soluseinän sisäpuolelle (Vestberg & Timonen 2018). Isäntäkasvi muodostaa haarakeräsen ympärille ympäryskalvon (PAM), joka on jatkumoa sen omalle solukalvolle (Lugtenberg (toim.) 2014, Vestberg & Timonen 2018). Kolonisaatio on tehokkainta kuorisoluissa, jossa arbuskelit muodostuvat (Lugtenberg (toim.) 2014).

Juuren ulkopuolinen sienirihmasto alkaa yleensä kehittymään kerästen kanssa samanaikaisesti. Rihmasto leviää juoksurihmojen avulla juuresta toiseen. Rihmastoverkoston muodostuminen alkaa juuresta kauempana olevien rihmojen haarautuessa kahtia (Vestberg & Timonen 2018).



Kuva 2. Mukailleen Vestberg & Timonen (2018), Mauseth (2016). Sienirihman kolonisoiman juuren perusrakenne.



Keräsienien ja isäntäkasvin välinen symbioosi on seurausta näiden kahden osakkaan vaihtamista signaaleista pre-symbiontissa eli varsinaista symbioosia edeltävässä vaiheessa. Isäntäkasvin juuret erittävät ritsosfääriin kasvihormonia nimeltä strigolaktoni (Lugtenberg (toim.) 2014, Chang ym., 2017). Vestberg & Timonen (2018) ja Vijayakumar (2018) mukaan kyseisen kasvihormonin erittäminen on sidoksissa kasvuympäristön fosforipitoisuuteen; jos fosforia on saatavilla vähän, strigolaktonia syntetisoidaan ja eritetään runsaasti. Maaperän fosforipitoisuus vaikuttaa siis suoraan keräsienijuuren syntyyn, sillä strigolaktoni on vastuussa kasviverson rakenteen sekä kasviparasiittien siementen itämisen säätelyn lisäksi myös sienirihmaston kasvusta ja haarautumisesta. Jos strigolaktonin synteesireitistä tai sen kuljetusproteiineista poistetaan geenejä, voidaan ehkäistä strigolaktonin synteesiä ja eritystä.

Chang ym. (2017) mukaan seuraavaksi AMF tuottaa lipokitoooligosakkarideita, jotka ovat Myc-tekijöitä (mycorrhizal factors, Myc-factors). Lipokitoooligosakkaridit aktivoivat symbioottisen signalointireitin juurten alueella, joka johtaa kalsiumin värähtelyyn (calcium oscillations). AMF infektoi isäntäkasvin juurisolun, jonka seurauksena hyphaalinen kasvu eli rihmojen kasvu juuren epidermaalisten solujen sisällä alkaa. Tämän jälkeen keräsieni pääsee kolonisoimaan isäntäkasvin juuristoa.

Strigolaktonin seurauksena kasviosakkaassa tuotetaan myös AMF-signaalimolekyyli, joka aktivoi isäntäkasvissa yleisen symbioosireitin (common symbiose pathway, CSP), joka on edellytys keräsienisymbioosin muodostumiselle (Chang ym. 2017).

### *3.3 Keräsienisymbioosin vaikutus isäntäkasviin*

Isäntäkasvin ja keräsienien välinen mutualistinen symbioosi muuttaa kasvin fysiologiaa muun muassa juurtumiseen, ravinteiden hankintaan ja kiertoon ja kasvin suojautumiseen vaikuttavilla tekijöillä (Barea ym. 2005, Lugtenberg (toim.) 2014).

Sienisymbioosi vaikuttaa positiivisesti kasvin terveyteen suojaamalla sitä erilaisilta ympäristön stressitekijöiltä. Tällaisia bioottisia eli eloperäisiä stressinaiheuttajia ovat muun muassa kasvia infektoivat patogeenit eli taudinaiheuttajat ja abioottisia eli elottomia stressinaiheuttajia ovat esimerkiksi kuivuus, suolastressi sekä maaperässä esiintyvät raskasmetallit (Barea ym. 2005, Azcón & Barea 2010, Lugtenberg (toim.) 2014).

Kasvin fysiologiset muutokset edesauttavat erilaisten mineraaliravinteiden kulkeutumista. Etenkin sellaisten aineiden kulkeutuminen helpottuu, joiden ionimuodot liikkuvat niukasti sekä

pieninä konsentraatioina (Barea ym. 2005, Lugtenberg (toim.) 2014). Esimerkkejä näistä ovat fosfaatti, ammonium, sinkki sekä kupari (Barea ym. 2005).

AMF-symbioosin hyödyllisyyteen isäntäkasville vaikuttaa kasvumaan ravinteikkuus. Fosforirikkaassa maaperässä keräsienisymbioosin merkitys on pieni. Kun maaperässä fosforia on saatavilla vain niukasti, parantaa keräsienisymbioosi palkokasvien kasvullista menestystä (Azcón & Barea 2010, Vestberg & Timonen 2018). Keräsienisymbioosi voi olla myös isäntäkasville haitallinen, jos sienisymbiontti käyttää suuren osan kasvin yhteyttämistuotteista suhteessa sen sieneltä saamiin ravinteisiin, jolloin kasvi kasvaa heikommin (Vestberg & Timonen 2018).

Keräsienisymbioosi on alun alkaen kehittynyt kivennäismaalla kasvavien kasvien juuristossa, jonka vuoksi se toimii kivennäismaassa parhaiten (Vestberg & Timonen 2018).

### *3.4 Fosforinotannan fysiologia*

Kasvi voi saada fosforia joko suoraan tai sienijuurireitin kautta (Smith & Smith 2011, Vestberg & Timonen 2018).

Suorassa fosforinotantareitissä epäorgaanista, liukoista fosforia (Pi) otetaan suoraan maaperästä Pi-kuljetusproteiinien avulla (Smith & Smith 2011, Vestberg & Timonen 2018).

Sienijuurireitissä Pi otetaan sienirihmaston samaan tapaan kuin suorassa reitissä (Vestberg & Timonen 2018). Pi pakataan rihman sisällä polyfosfaatiksi (PolyP), joka koostuu lineaarisista, fosfoanhydridisidoksilla toisiinsa kytkeytyneistä Pi-molekyyleistä (Smith & Smith 2011, Vestberg & Timonen 2018). Soluliman vakuoleihin pakattu polyfosfaatti kuljetetaan kasvin juurten ja sienirihmaston yhtymäkohtaan. Jos kasvi saa niukasti fosforia, pilkotaan polyfosfaatti tässä vaiheessa takaisin liukoiseen Pi-muotoon. Mekanismi, jolla fosfaatti kulkeutuu sienin ja kasvin välitilaan, on toistaiseksi tuntematon. Kasvin ja sienin solut voivat erittää lysofosfatidyylikoliinia (LPC), jonka konsentraation lisääntyminen lisää fosforia kuljettavien proteiinien määrää (Vestberg & Timonen 2018). Fosforin kuljetukseen tarvitaan protonigradientti, jota kasvi ja keräsieni ylläpitävät protonipumpun avulla (Smith & Smith 2011, Vestberg & Timonen 2018).

## 4 Typpibakteerit

Ilmakehästä noin 80% on typpeä, mutta se on siellä lähes kaikille organismeille hyödyttömässä muodossa. Typpi pääsee biologiseen kiertoon ainoastaan fiksoituna tai kun se on yhdistynyt muiden alkuaineiden, kuten vedyn tai hapen kanssa (Brill 1977).

Ritsobi on yleisnimitys tietyille gramnegatiivisille alfa- ja betaproteobakteereille (Lindström & Mousavi 2020), jotka muodostavat kolonisoimansa kasvin juuristoon juurinystyröitä, joiden avulla ne pystyvät muuttamaan ilmakehän typpeä kasveille sopivaan muotoon eli ammoniumioneiksi (Brill, 1977, Azcón & Barea 2010, Chang ym. 2017, Lindström & Mousavi 2020). Typensitobakteerit pystyvät sitomaan luonnossa esiintyvää, kaksiatomista typpeä. Kyseisillä organismeilla on typensidontaan tarvittava spesifi entsyymi, nitrogenaasi, joka toimii juurinystyröissä (Brill 1977, Azcón & Barea 2010).

Kasvit eivät pysty tiettyjen typensitobakteerien tavoin muuttamaan typpeä itselleen sopivaan muotoon, mutta ne voivat muodostaa symbionttisen vuorovaikutussuhteen typensidontaan soveltuvien organismien kanssa. Mitä suurempi typensitobakteerin sisältävä juurinystyrä on, sitä enemmän se kykenee sitomaan ilmakehän typpeä (Antunes & Goss 2005). Saamastaan tuestä kasviosakas antaa bakteerille vastineeksi hiiliyhdisteitä, jota tarvitaan bakteerin fysiologian ylläpitämiseen sekä typensidontaan tarvittavan ATP:n tuottamiseen (Valentine ym. 2011).

Palkokasvit kykenevät ottamaan maaperän typpeä nitraatteina ( $\text{NO}_3^-$ ) tiettyjen epidermaali- ja kortikaalijuurisoluissa sijaitsevien solukalvon kuljettajaproteiinien avulla. Palkokasvit pystyisivät elämään pelkästään typpibakteerien sitoman eli symbioottisesti sidotun typen avulla, mutta se vaatisi niin paljon energiaa, että osa muutoin kasvuun käytettävissä olevasta energiasta jouduttaisiin allokoimaan siihen. Maaperään ulkoisesti lisätty typpi nopeuttaa palkokasvien kasvua, koska energiaa ei tarvitse käyttää typensidontaan (Valentine, Benedito, & Kang 2011).

### 4.1 Juurinystyröiden muodostuminen

Isäntäkasvi erittää ritsosfääriin flavonoideja ja isoflavonoideja, sekundäärimetaboliitteja, jotka tuottavat juurinystyröiden muodostumiseen tarvittavia Nod-faktoreita (Lugtenberg (toim.) 2014, Chang ym. 2017). Antunes & Goss (2005) sekä Chang ym. (2005) mukaan juurinystyröiden muodostumiseen tarvitaan Nod-geenien ekspressoitumista. NodA, B ja C –

geenit ovat välttämättömiä juurinystyröiden muodostumiselle, ja kaikenlaiset mutaatiot näissä geneeissä tuottaa Nod- -fenotyyppiä, eli juurinystyrättömiä kasveja. Ritsobit ovat isäntäspesifejä, eli kaikki ritsobit eivät kykene muodostamaan symbioosia kaikkien kasvien kanssa. Isäntäspesifisyydestä ovat vastuussa NodD-geenit, joita on kullakin lajilla yleensä vain yksi.

Useissa ritsobeissa Nod-geenit ovat järjestäytyneet useisiin operoneihin, joita yleensä edeltää Nod-box-promoottori, joka sisältää runsaasti konservoituneita DNA-jaksoja (Antunes & Goss 2005). Chang ym. (2017) mukaan isäntäkasvi tunnistaa sille spesifit Nod-faktorit, jotka sitten käynnistävät symbioottisen signalointireitin. Signalointireitti johtaa kolonisaatiota edeltäviin kalsiumin värähtelyihin epidermi- ja kortikaalisoluissa. Isäntäkasvin hiusjuuret tarttuvat ritsobin pintaan ja kasvavat sen ympärille, jonka avulla bakteeri pääsee juurisolukon sisälle. Juurisolun tuma siirtyy infektoituneelle puolelle solua ja endoplasmakalvosto sekä sytoskeleton ryhmittyvät uudelleen.

Chang ym. 2017 mukaan joko kasvin sisäisen tai sen ulkoisen ärsykkeen stimuloimana tuotetuilla kasvihormoneilla on vaikutusta kasvin kehityksen lisäksi myös juurinystyröiden muodostumiseen, sillä ne säätelevät juurten erilaistumista ja stimuloivat solunjakautumista. Sytokiniini ja auksiini ovat juurinystyröiden muodostumiseen vaikuttavia kasvihormoneja. Sytokiniinien vaikutus muistuttaa Nod-faktoreiden vaikutusta, kun niitä lisätään ulkoisesti sinimailasen *Medicago sativan* juuriin.

#### 4.2 Typpibakteerien vaikutus isäntäkasviin

Isäntäkasvi saa huomattavan kilpailuedun muihin kasveihin muodostamalla symbioosin typensitojabakteerin kanssa runsaamman typensaannin ansiosta (Lugtenberg (toim.) 2014). Useimmat orgaaniset yhdisteet sisältävät typpeä: sitä on esimerkiksi proteiineissa, kasvunsäätelijöissä, vitamiineissa ja klorofylleissä eli viherhiukkasissa (Igiehon & Babalola 2018, Vijayakumar 2018, Lindström & Mousavi 2020). Erityisesti typen vaikutus kasvuun on huomattavaa (Lindström & Mousavi 2020, Premieri, Magnoli, Koffel, Stürmer & Bever 2021). Typpioksidia (NO) tuotetaan ritsobin ja isäntäkasvin symbioosin syntymisen alkuvaiheissa. Typpioksidi indusoi kasvin suojautumismekanismeja patogeenejä vastaan (Lindström & Mousavi 2020).

### 4.3 Typensidonnan fysiologia

Brill (1977) ja Lugtenberg (toim.) 2014 mukaan typensidonta alkaa juurisolun solulimassa tapahtuvalla glykolyysillä, jossa typensidontaankin tarvittava kuusihiilinen sokeri ( $C_6H_{12}O_6$ ) hajotetaan kahdeksi pyruvaatiksi eli palorypälehapoksi. Tästä poistuu yksi kahteen happiatomiin sitoutunut hiili eli hiilidioksidi ( $CO_2$ ) ilmakehään. Vetyatomit sitoutuvat vedynsiirtäjäentsyymi NAD:iin ja koentsyymi-A kuljettaa jäljelle jääneen kahden hiilen yhdisteen typensitojabakteerin sisälle sitruunahappokierto. NAD kuljettaa vetyatomit solukalvolla sijaitseville elektroninsiirtäjille, jotka hajottavat vetyatomit protoneiksi ja elektroneiksi. Niiden muodostaman varauseron eli protonigradientin avulla entsyymi nimeltä ATP-syntaasi valmistaa ATP:tä eli adenosiinitrifosfaattia ADP:stä eli adenosinidifosfaatista ja fosfaatista. Tämän jälkeen  $H^+$  ja  $e^-$  sitoutuvat jälleen yhteen muodostaen vetyatomeita. Valtaosa ATP-syntaasin tuottamasta energiasta kuluu nitrogeaasientsyymin toimintaan.

Nitrogeaasi vaatii runsaasti energiaa ilmakehän molekulaarisen typen ( $N_2$ ) sitomiseen, sillä kahden tyypiatomin välillä on vahva ja stabiili kolmoissidos on ensin hajotettava (Valentine ym., 2011). Ja koska molemmille tyypiatomeille jää niille tyypillisesti kolme vapaata sidoselektronia, sitoutuu jokaiseen niihin yksi vetyatomi, jolloin muodostuu nitraattia ( $NH_3^-$ ). Ammoniakki toimii solun vesiympäristössä emäksenä, joten siitä muodostuu hyvin helposti ammoniumioneja ( $NH_4^+$ ), jotka ovat myös kasville soveltuvia ravinteita (Brill 1977, Lugtenberg (toim.) 2014).

Typensidonnassa tapahtuu hapetus-pelkistysreaktio, jossa glukoosi, eli elektronien luovuttaja, hapettuu ja typpi, eli elektronien vastaanottaja, pelkistyy (Brill 1977). Tätä tapahtumaa voidaan kuvata seuraavanlaisella reaktioyhtälöllä:

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16Pi$$
 (Brill 1977, Valentine ym. 2011, Lugtenberg (toim.) 2014)

Kasveille käyttökelpoista tyyppiä, ammoniumia ( $NH_4^+$ ) voidaan myös valmistaa teollisesti vedystä sekä ilmakehän tyypestä Haberin prosessiksi kutsutun reaktion mukaisesti. Typen valmistaminen teollisesti ei ole ympäristöystävällinen prosessi, sillä reaktioon tarvittava energia on peräisin fossiilisista polttoaineista (Valentine ym. 2011, Lugtenberg (toim.) 2014). Lisäksi biologisesti sidottu typpi on jo valmiiksi orgaanisessa muodossa (Valentine ym. 2011). Yhden typpimolekyylin konversio kahdeksi ammoniumiksi vaatii 12-24 molekyyliä ATP:tä (Brill 1977).

## 5 Keräsienen ja typpeä sitovien bakteerien vuorovaikutus ja niitä yhdistävät tekijät

Barea ym. (2005) mukaan symbiontit hyödyttävät isäntäkasvin lisäksi myös toinen toistaan. Typeä sitovat juurinystyrät tarvitsevat runsaasti fosforia muodostuakseen, jota edesauttaa symbioosi fosforinotantaa tehostavan keräsienen kanssa. Juurinystyräbakteerien sitoma typpi on edellytys keräsienen seinärakenteiden yleisimmälle rakenneosalle, kitiinille. Ritsobien toimesta tapahtuva typensidonta on myös tärkeää kasvin tasapainoisen fysiologisen tilan ylläpidossa, mikä on oleellista keräsienen muodostumiselle ja toiminnalle.

### 5.1 Yleinen symbioosireitti (*Common symbiotic pathway*)

Genre & Russo (2016) mukaan yleiseksi symbioosireitiksi (common symbiotic pathway, CSP) kutsutaan hypoteettista signaalintireittiä, joka on yhteinen sekä ritsobi-isäntäkasvi-, että AM-isäntäkasvi-symbiooseille (Kuva 3. Genre & Russo 2016). Sekä juurinystyröiden, että sienijuuren muodostumisessa on mukana samat komponentit. CSP toimii alavirtaan (kohti 3'-päättä) molempien symbionttien signaalien vastaanottajana ja ylävirtaan (kohti 5'-päättä) halutun symbiontin aktivaatiossa. Se, että kumpaa symbionttia aktivoidaan, riippuu tapahtuvasta geeniekspressiosta.

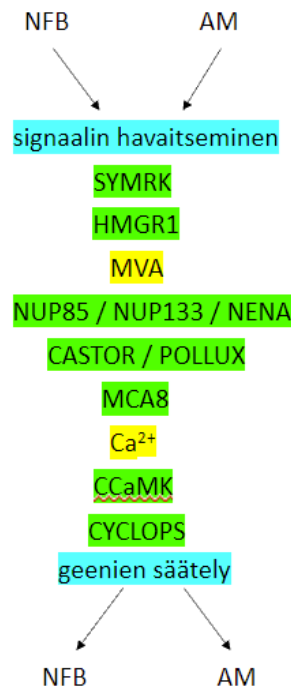
Ensimmäinen signaalintireitissä esiintyvä CSP-proteiini on kalvoon sitoutunut reseptorinkaltainen kinaasi, SYRK. Kyseinen proteiini toimii vuorovaikutuksessa esimerkiksi Nod-faktori-reseptorien kanssa. Seuraavan komponentin, HMGR1-entsyymin, aktivoiduttua käynnistyy mevalonaatin tuotanto sytoplasman puoleisella plasmakalvolla.

Seuraava ryhmä CSP-proteiineja sijaitsee nukleoporiinikompleksissa, joka koostuu NUP85-, NUP133- ja NENA-proteiineista.

Tuman sytoplasmasta erottavassa tumakotelossa sijaitsee myös MCA8-niminen ATP-voimalla toimiva kalsiumpumppu sekä CASTOR ja POLLUX, jotka molemmat ovat kationikanavia. CASTOR ja POLLUX ovat osana kalsiumin voimakkaita värähtelyitä (calcium oscillations), jossa  $\text{Ca}^{2+}$  vapautuu tumakotelosta, minkä seurauksena alkaa vastakkaissuuntainen virtaus  $\text{K}^{+}$ -ioneja, mikä tapahtuu näiden kahden kationikanavan lävitse. MCA8 tasoittaa kalsiumkonsentraation.

Seuraava yleisen symbioosireitin vaihe tapahtuu tumakotelon sisällä olevassa tumalimassa. Kalsiumin värähtelyt yhdessä kalmoduliinin kanssa aktivoivat kalsiumista ja kalmoduliinistä

riippuvaisen kinaasin, CCaMK:n. CCaMK fosforyloi CYCLOPS:n, mikä on edellytys geeniekspression säätelylle. Geeniekspression säätely voi tapahtua joko suoraan, esimerkiksi NIN-promoottorin kautta, tai epäsuorasti toisten transkriptiotekijöiden toiminnan kautta (Genre & Russo, 2016).



Kuva 3. Mukailleen Genre & Russo (2016). Yleisen symbioosireitin (Common symbiotic pathway, CSP) tärkeimmät komponentit ja niiden hypoteettinen järjestys. NFB=typpibakteeri, AM=keräsieni.

## 5.2 Hiilen allokointi

Molemmat symbiontit käyttävät isäntäkasvin fotosynteesistä peräisin olevia hiiliyhdisteitä (Ossler ym. 2015). Luonnollisissa olosuhteissa keräsieni sekä ritsobit kolonisoivat juuren miltei samanaikaisesti. Nämä symbiontit eivät kuitenkaan ilmeisesti kilpaile samoista infektoitumiskohdista (Ossler ym. 2015, Vestberg & Timonen 2018).

## 5.3 Kilpailu symbionttien välillä

Kun isäntäkasvin fotosynteesi on jostain syystä rajallista, näyttää keräsienellä olevan kilpailuetu hiilihydraattien saannista typensitojabakteeriin nähden (Barea ym. 2005, Azcón & Barea 2010). Azcón & Barea (2010) mukaan maaperässä, jossa fosforia esiintyi vain vähän, AM-kolonisaation varhaisessa vaiheessa juurinystyröiden kasvu suppressoitui. Kolonisaation

edetessä fosforinhankinta tehostui, typensitojabakteerinystryöiden ja isäntäkasvin kasvu parani, ja samanaikaisesti myös typensidonta lisääntyi. Tästä voidaan päätellä, että AMF olisi dominoiva symbiontti kolmiosaisessa vuorovaikutuksessa. Keräsien rooli fosforin kuljetuksessa hyödytti sekä isäntäkasvia, että juurinystryöiden toimintaa.

Isäntäkasvi voi allokoida hiilivarastonsa hyödyllisemmälle symbiontille ja syrjäyttää hyödyttömämmän (Vestberg & Timonen 2018).



## 6 Kolmiosaisen vuorovaikutuksen hyödyntäminen maataloudessa

Barea ym. (2005) ja Azcón & Barea (2010) mukaan maaperän mikrobeja pyritään hyödyntämään eri tavoin kestävässä maataloudessa. Mikro-organismit ovat tärkeässä asemassa ravinteiden kierron kannalta niin maatalous- kuin luonnollisissa ekosysteemeissä. Joitakin hyödyllisistä mikrobeista voidaan käyttää niin sanottuina ymppeinä, eli siemeneen tai maahan lisättyinä siirteinä, joiden tarkoitus on edesauttaa kasvien kasvua sekä terveyttä esimerkiksi vaikuttaen kasvin ravinnetalouteen sitä aktivoivasti tai auttaen erilaisten kasveille tyypillisten patogeenien torjunnassa. Esimerkiksi AM-ymppeä suojaa kasvin kokeman kuivuuden haitallisilta vaikutuksilta ja auttaa palkokasveja sietämään ennen aikaista, kuivuuden indusoimaa juurinystyröiden seneskenssiä (Barea ym. 2005, Azcón & Barea 2010).

### 6.1 Keräsienijuurisymbioosin hyödyntäminen maataloudessa

Keräsieni-itiöitä ja –rihmastoa on jo luonnostaan runsaasti suomalaisessa peltomaassa, minkä vuoksi keräsienijuurten siirrostusta tärkeämpää on luontaisten keräsienijuurikantojen toiminnan optimointi. Useimmiten kullekin kasvuympäristölle luontainen keräsienikanta on myös sille paras ja tarpeettoman ympin tekeminen mahdollisesti häiritsee resurssikilpailulla luontaisen sieniyhteisön toimintaa (Vestberg & Timonen 2018).

Vestberg & Timonen (2018) sekä Vijayakumar (2018) mukaan keräsienijuurisymbioosin toimivuuteen vaikuttaa kasvin, sienien ja maan keskinäinen sopivuus ja näiden välinen vuorovaikutus. Kaikki keräsienijuurten genotyypit eivät välttämättä ole hyödyllisiä isäntäkasvilleen. Keräsienijuuri on isäntäkasville kustannustekijä jos se verottaa kasvin resursseja enemmän kuin se sille antaa. Tällainen tilanne voi olla esimerkiksi jos kasvilla on itsellään jo todella haaroittunut juuristo, joka on tehokas ravinteiden otossa. Nykyään peltomaat ovat runsaasti fosforilla lannoitettuja, joka vähentää keräsienijuuren hyödyllisyyttä huomattavasti. Symbioosia on tällöin jopa haitallista ylläpitää.

Vestberg & Timonen (2018) mukaan luontainen sienikanta voi vähentyä esimerkiksi runsaan kivennäislannoitteiden tai sienitautien torjunta-aineiden käytön seurauksena. Ylilaidunnus tai eroosio voi aiheuttaa muokkauskerroksen kulumista ja siten vaikuttaa sienisymbiooseihin. Myös lajisto tai ekotyyppi voi muuttua tehottomammaksi. Viljelykierto vaikuttaa siihen, kuinka paljon keräsieni-itiöitä tai rihmastoa peltomaassa esiintyy, sillä osa lajeista on tehokkaampia sienijuurisymbioosien muodostamisessa kuin toiset. Jotkin kaalit erittävät kemiallisia yhdisteitä, jotka estävät sienijuurten muodostumisen.

Vestberg & Timonen (2018) mukaan keräsieniä voidaan eristää maasta ja viljellä niitä niille sopivien isäntäkasvin juuristossa ja siirrostaa uusiin kasveihin. Käytössä oleva kasvumaa tulee laimentaa steriilillä hiekalla suhteessa 1:1, jonka jälkeen se annostellaan ruukkuihin, joissa viljellään pyydyskasvia, esimerkiksi jotakin apilalajiketta. Pyydyskasveja viljellään vähintään neljä kuukautta, jonka jälkeen syntyneet itiöt seulotaan ja niiden lajit määritellään mikroskopoinnin avulla. Keskenään samannäköiset itiöt siirretään uusien kasvien siementaimen juuriston päälle niukkafosforiselle kasvualustalle. Tämän puhdasviljelmän onnistuessa ruukkuihin kuuluisi muodostua yhtä keräsienilajia edustavia itiöitä.

## 6.2 *Typeä sitovien bakteerien hyödyntäminen maataloudessa*

Symbioottinen vuorovaikutus palkokasvien ja ritsobien välillä on useimmiten kasvien pääasiallinen typenlähde. Symbioosi tuottaa typensidonnan avulla noin 80% kasvin tarvitsemasta typestä (Igiehon & Babalola 2018). On arvioitu, että ritsobeilla ympätyt sadot tuottavat viidestä seitsemään kertaa vähemmän kasvihuonepäästöjä muihin satoihin verrattuna (Vijayakumar 2018).

Igiehon (2018) mukaan ritsobeilla on havaittu olevan positiivisia vaikutuksia satoisuuteen lisäämällä kasvien sekä maanalaista, että -päällistä biomassaa. Tavallisin tapa hyödyntää ritsobeita maataloudessa on niiden ympppäminen esimerkiksi siemeneen suojaapilleröinnin (eng. seed coating) avulla. Mfilinge, A., Mtei, K. & Ndakidemi, P. (2014) tutkimusten mukaan ritsobiymppi lisäsi typensaannin lisäksi myös muiden ravinteiden ottoa. Kyyhkynherneen *Cajanus canan* kaliuminsaanti lisääntyi ritsobiympin ansiosta. Tarhapavulla *Phaseolus vulgaris* kaliumin lisäksi myös fosforin, magnesiumin kalsiumin ja rikin saanti parani merkittävästi.

Symbionttinen suhde palkokasvin ja typeä sitovien bakteerien välillä on lupaava vaihtoehto kestävämpään maatalouteen. Toistaiseksi kuitenkin vain palkokasvit pystyvät muodostamaan symbioosin ritsobien kanssa. Seuraavana askeleena olisi se, että tämä ominaisuus saataisiin myös muille kuin palkokasveille, etenkin tärkeimmille viljakasveille esimerkiksi geneettisesti muokkaamalla (Lugtenberg (toim.) 2014).

Lugtenberg (toim.) 2014 mukaan ritsobisymbioosin siirrostaminen muille kuin palkokasveille voisi minimoida ulkoisten typpilannoitteiden käyttöä viljelyssä. Tämä tekisi sekä ruoan, rehun sekä bioenergian viljelystä halvempaa, mutta suojelisi samalla myös ympäristöä.

Ritsobit ovat hyvin isäntäspesifejä, minkä vuoksi on hyvin hankalaa muodostaa symbiooseja muiden kuin tiettyjen lajien kanssa. Ritsobilajike NGR234 pystyy muodostamaan symbioosin 353:n palkokasvin kanssa ja on mahdollinen kandidaatti ritsobisymbioosin siirtämiseen muille kuin palkokasveille. Tarvittavan symbioosikoneiston muodostamiseksi isäntäkasvin geneettinen rakenne tulee hienosäätää niin, että se sallii juurinystyröiden muodostumiseen tarvittavat vaiheet (Lugtenberg (toim.) 2014).

Vaihtoehtoinen lähestymistapa ritsobien typensidontakyvyn siirtämiseksi muille kuin palkokasveille on manipuloida mikrosymbiontteja tai luonnollisia endofyyttejä. Ritsobit pystyvät hyödyntämään jo olemassa olevaa infektoitumisreittiä ei-palkokasveilla ja kolonisoimaan kasvin endofyyttinä (Lugtenberg (toim.) 2014).

### *6.3 Mikrobiomin hyödyntäminen maataloudessa*

Igiehon (2018) mukaan yksittäisen mikro-organismin käytön lisäksi myös kokonaisten mikrobiomien identifiointi sekä niiden hyödyntäminen sadon tuottavuuden lisäämisessä on tärkeää. Koko kutakin kasvia ympäröivällä mikrobiomilla on vaikutusta kasvin terveyteen, ja siitä puhutaankin usein kasvin toisena genomina. Metaorganismilla tarkoitetaan isäntäkasvia ja siihen sidoksissa olevaa mikrobialaista yhteisöä.

Esimerkiksi ritsobien hyödylliset vaikutukset kasvavat entisestään, kun ympäristöön lisätään myös toisia mikro-organismeja. Usean mikro-organismin ympäristössä tietyt mikrobit edistävät toisten mikrobien toimintaa ja niiden vaikutukset täydentävät toinen toistaan (Igiehon 2018, Primieri ym. 2021).

## 7 Johtopäätökset

Maaperän mikrobien ja useampiosaisien vuorovaikutuksien, kuten typpibakteerien, keräsienten ja palkokasvin välisen kolmiosaisen vuorovaikutuksen, hyödyntäminen ruoantuotannossa voi olla osa tulevaisuutta, jossa ruokaa täytyy tuottaa enemmän, mutta ympäristöystävällisemmin. Tällaisten vuorovaikutuksien hyödyntäminen viljelyssä voi parantaa satoisuutta lannoitteiden tapaan, mutta ilman lannoitteiden ympäristöön kohdistuvia haittavaikutuksia.

Kolmiosaisen vuorovaikutuksen komponenttien geneettinen modifiointi on tekijä, jolla voidaan päästä lähemmäs kestävämpää ruoantuotantoa. Hyvä esimerkki tällaisesta tutkimuksesta on tutkimus liittyen ritsobisymbioosin siirtämiseen muille kuin palkokasveille.

Kolmiosaisen vuorovaikutuksen hyödyntämisen kannalta on tärkeää selvittää symbioosien samankaltaisuudet ja eroavaisuudet sekä niiden muodostumiseen ja interaktioihin vaikuttavat mekanismit ja komponentit. Yleinen symbioosireitti on yhteinen sekä ritsobin isäntäkasvin, että keräsien ja isäntäkasvin väliselle symbioosille. Symbioosit vaikuttavat isäntäkasvin lisäksi myös toisiinsa. Joissain tilanteissa jommastakummasta symbioosista on kasviosakkaalle enemmän haittaa kuin hyötyä. Näiden monimutkaisten vuorovaikutusten verkostojen selvittäminen voi olla ratkaisu kestävämpään ruoantuotantoon.

## 8 Läheteet

Antunes, P.M. & Goss, M.J. (2005). Communication in the Tripartite Symbiosis Formed by Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Rhizobia and Legume Plants: A Review. Teoksessa R.W. Zobel & S.F. Wright (toim.) *Roots and Soil Management: Interactions between Roots and the Soil*. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr48.c11>

Azcón R. & Barea J.M. (2010). Mycorrhizosphere Interactions for Legume Improvement. Teoksessa Khan M.S., Musarrat J., Zaidi A. (toim.) *Microbes for Legume Improvement*. Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-211-99753-6\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-211-99753-6_10)

Barea J.M. & Werner D., Azcón-Guilar C., Azcón R. (2005). Interactions of Arbuscular Mycorrhiza and Nitrogen-Fixing Symbiosis in Sustainable Agriculture. Teoksessa Werner D., Newton W.E. (toim.) *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment*. Springer. [https://doi.org/10.1007/1-4020-3544-6\\_10](https://doi.org/10.1007/1-4020-3544-6_10)

Brill, W. J. (1977). Biological Nitrogen Fixation. *Scientific American*, 236(3), s. 68–81. <http://www.jstor.org/stable/24953938>

Chang C., Nasir F., Ma L. & Tian C. (2017). Molecular Communication and Nutrient Transfer of Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Symbiotic Nitrogen-Fixing Bacteria, and Host Plant in Tripartite Symbiosis. Teoksessa Sulieman S., Tran LS. (toim.) *Legume Nitrogen Fixation in Soils with Low Phosphorus Availability*. Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-55729-8\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-55729-8_9)

FAO. 2019. The State of the World's Biodiversity for Food and Agriculture, J. Bélanger & D. Pilling (eds.). FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments. Rome. 572 pp. <https://www.fao.org/3/CA3129EN/CA3129EN.pdf>

Genre A. & Russo G. (2016). Does a Common Pathway Transduce Symbiotic Signals in Plant–Microbe Interactions? *Frontiers in Plant Science*, vol 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00096>

Igiehon N., Babalola O. (2018). Rhizosphere Microbiome Modulators: Contributions of Nitrogen Fixing Bacteria towards Sustainable Agriculture. *Int J Environ Res Public Health*. <https://doi.org/10.3390/ijerph15040574>

Lindström, K. & Mousavi, S. A. (2020). Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbial biotechnology*, 13(5), 1314–1335. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13517>

Lugtenberg, B. (toim.). (2014). Principles of Plant-Microbe Interactions : Microbes for Sustainable Agriculture, Part IV: Plant growth promotion by microbes <https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3>

Mauseth J. D. (2016). *An Introduction to Plant Biology, sixth edition*. Jones & Bartlett Learning.

Mfilinge, A., Mtei, K. & Ndakidemi, P. (2014). Effect of Rhizobium Inoculation and Supplementation with Phosphorus and Potassium on Growth and Total Leaf Chlorophyll (Chl) Content of Bush Bean *Phaseolus vulgaris*, L.. *Agricultural Sciences*. 5. 1413-1426. <https://doi.org/10.4236/as.2014.514152>.

Ossler, J.N., Zielinski, C.A. & Heath, K.D. (2015). Tripartite mutualism: Facilitation or trade-offs between rhizobial and mycorrhizal symbionts of legume hosts. *American Journal of Botany*, 102, s. 1332-1341. <https://doi.org/10.3732/ajb.1500007>

Primieri, S., Magnoli, S. M., Koffel, T., Stürmer, S. L. & Bever, J. D. (2021). Perennial, but not annual legumes synergistically benefit from infection with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia: A meta-analysis. *The New phytologist*. <https://doi.org/10.1111/nph.17787>

Smith S. E. & A. F. Smith (2011). Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Nutrition and Growth: New Paradigms from Cellular to Ecosystem Scales. *Annual Review of Plant Biology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103846>

Valentine, A.J., Benedito, V.A. & Kang, Y. (2018). Legume Nitrogen Fixation and Soil Abiotic Stress: From Physiology to Genomics and Beyond. Teoksessa J.A. Roberts (toim.) *Annual Plant Reviews online*. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0456>

Vestberg M. & Timonen S. (2018). *Rihman kiertämät - Kasvien ja sienten erottamaton elämä*. Vestberg Mauritz.

Vijayakumar V. (2018). Symbiotic Tripartism in the Model Plant Family of Legumes and Soil Sustainability. Teoksessa Meena R., Das A., Yadav G., Lal R. (toim.) *Legumes for Soil Health and Sustainable Management*. Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0253-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0253-4_6)

Withers, P., Neal, C., Jarvie, H., & Doody, D. (2014). Agriculture and Eutrophication: Where Do We Go from Here? *Sustainability*, 6(9), 5853–5875. <https://doi.org/10.3390/su6095853>